

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing:

11 September 1998 (11.09.98)

International application No.:

PCT/JP98/00924

Applicant's or agent's file reference:

YCT-316

International filing date:

06 March 1998 (06.03.98)

Priority date:

07 March 1997 (07.03.97)

Applicant:

KITAMURA, Hidetomo

1. The designated Office is hereby notified of its election made:



in the demand filed with the International preliminary Examining Authority on:

15 April 1998 (15.04.98)



in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was



was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Authorized officer:

J. Zahra

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

発信人 日本国特許庁（国際予備審査機関）

出願人代理人

社 本 一 夫

殿

あて名

〒 100 0004

東京都千代田区大手町二丁目2番1号

新大手町ビル206区

湯浅法律特許事務所

PCT

国際予備審査報告の送付の通知書

（法施行規則第57条）

〔PCT規則71.1〕

発送日
（日、月、年）

02.03.98

出願人又は代理人
の書類記号

YCT 316

重要な通知

国際出願番号

PCT/JP98/00924

国際出願日

（日、月、年） 06.03.98

優先日

（日、月、年） 07.03.97

出願人（氏名又は名称）

中 外 製 薬 株 式 会 社

1. 国際予備審査機関は、この国際出願に関して国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、それらをこの送付書とともに送付することを、出願人に通知する。

2. 国際予備審査報告及び付属書類が作成されている場合には、すべての選択官庁に通知するために、それらの写しを国際事務局に送付する。

3. 選択官庁から要求があったときは、国際事務局は国際予備審査報告（付属書類を除く）の英語の翻訳文を作成し、それをその選択官庁に送付する。

4. 注 意

出願人は、各選択官庁に対し優先日から30月以内に（官庁によってはもっと遅く）所定の手続（翻訳文の提出及び国内手数料の支払い）をしなければならない（PCT39条（1））（様式PCT/IB/301とともに国際事務局から送付された注を参照）。

国際出願の翻訳文が選択官庁に提出された場合には、その翻訳文は、国際予備審査報告の付属書類の翻訳文を含まなければならない。

この翻訳文を作成し、関係する選択官庁に直接送付するのは出願人の責任である。

選択官庁が適用する期間及び要件の詳細については、PCT出願人の手引き第Ⅱ巻を参照すること。

名称及びあて名

日本国特許庁（IPEA/JP）

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員

特 許 庁 長 官

4B

8214

電話番号 03-3581 1101 内線 3448

様式PCT/IPEA/416（1992年7月）

（添付用紙の注意書きを参照）

THIS PAGE BLANK (USPTO)

EP

US

PCT

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)

[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-316	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 98/00924	国際出願日 (日.月.年) 06.03.98	優先日 (日.月.年) 07.03.97
出願人 (氏名又は名称) 中外製薬株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

2. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

3. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド及び／又はアミノ酸配列リストを含んでおり、次の配列リストに基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願と共に提出されたもの

☒ 出願人がこの国際出願とは別に提出したもの

☐ しかし、出願時の国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨を記載した書面が添付されていない

☐ この国際調査機関が書換えたもの

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 _____ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

THIS PAGE BLANK (USPTO)

特 許 協 力 条 約

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

(P C T 3 6 条及びP C T 規則70)

出願人又は代理人 の書類記号 Y C T 3 1 6	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知(様式P C T / I P E A / 4 1 6)を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 9 8 / 0 0 9 2 4	国際出願日 (日.月.年) 0 6 . 0 3 . 9 8	優先日 (日.月.年) 0 7 . 0 3 . 9 7
国際特許分類 (I P C) I n t . C l ^o C 1 2 N 5 / 0 6 , C 1 2 Q 1 / 6 8 , G 0 1 N 3 3 / 5 0 , A 6 1 K 3 1 / 0 0 , 3 5 / 0 0		
出願人 (氏名又は名称) 中 外 製 薬 株 式 会 社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (P C T 3 6 条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(P C T 規則70.16及びP C T 実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I ☒ 国際予備審査報告の基礎
- II ☐ 優先権
- III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV ☐ 発明の単一性の欠如
- V ☒ P C T 3 5 条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI ☐ ある種の引用文献
- VII ☐ 国際出願の不備
- VIII ☐ 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 1 5 . 0 4 . 9 8	国際予備審査報告を作成した日 2 3 . 0 2 . 9 9		
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員)	4 B	8 2 1 4
	内 田 俊 生 印 電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8		

様式P C T / I P E A / 4 0 9 (表紙) (1998年7月)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

1. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
 応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
 PCT 規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- ☐ 明細書 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 請求の範囲 第 _____ 項、 出願時に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 PCT 19 条の規定に基づき補正されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 請求の範囲 第 _____ 項、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 図面 第 _____ ページ/図、 出願時に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 図面 第 _____ ページ/図、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの
- ☐ 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 出願時に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
 明細書の配列表の部分 第 _____ ページ、 _____ 付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出された PCT 規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT 規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出された PCT 規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☒ この国際出願に含まれる書面による配列表
☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT 規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(ii))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)

請求の範囲 1 - 13 有
請求の範囲 無

進歩性(I S)

請求の範囲 1 - 13 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性(I A)

請求の範囲 1 - 13 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

請求の範囲1 - 13に記載された発明は、国際調査報告で引用したいずれの文献にも記載されておらず、かつ、当業者にとって自明なものでもない。

THIS PAGE BLANK (USPTO)



(51) 国際特許分類6 C12N 5/06, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 31/00, 35/00, 38/00 // (C12N 5/06, C12R 1:91)	A1	(11) 国際公開番号 WO98/39414 (43) 国際公開日 1998年9月11日(11.09.98)
(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00924 (22) 国際出願日 1998年3月6日(06.03.98) (30) 優先権データ 特願平9-70556 1997年3月7日(07.03.97) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo, (JP) (72) 発明者: および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 北村 秀智(KITAMURA, Hidetomo)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門三丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP) (74) 代理人 弁理士 社本 一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.) 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 湯浅法律特許事務所 Tokyo, (JP)		(81) 指定国 AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, GH, GM, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーロアジア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG). 添付公開書類 国際調査報告書
(54)Title: NOVEL CELL LINE AND SCREENING METHOD WITH THE USE OF THE SAME (54)発明の名称 新規細胞株および本細胞株を用いたスクリーニング法 (57) Abstract A cloned cell line of undifferentiated mesenchymal cells, capable of differentiating into chondrocytes and adipocytes and established from a normal matured animal; and a method for screening cell differentiation regulators. Specifically, a cell line capable of differentiating into chondrocytes and adipocytes and characterized by originating in a normal matured animals; a method for screening cell differentiation regulators by using the above cell line; screening kits containing the above cell line; cell differentiation regulators obtained by the above screening method; and drugs containing the above differentiation regulators.		

本発明の目的は、正常な成熟動物から軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立し、細胞の分化調節物質のスクリーニング方法を確認することである。本発明により、正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株、当該細胞株を使用する細胞の分化調節物質のスクリーニング法、当該細胞株を含むスクリーニング用キット、上記スクリーニング法に得られる細胞の分化調節物質、並びに上記分化調節物質を含有する医薬が提供される。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

[illegible]

明 細 書

新規細胞株および本細胞株を用いたスクリーニング法

技術分野

本発明は、正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞
5 に分化する能力を有する新規な細胞株、並びに、当該細胞株を用いる未分化間葉系細胞から軟骨細胞および脂肪細胞への分化を調節する物質などを簡便に探索することを可能とする新しい *in vitro* のスクリーニング方法に関するものである。

背景技術

10 従来から軟骨細胞は、軟骨内骨化による骨格の形成や関節の形成による運動の円滑化など、脊椎動物が生存する上で重要な機能を果たしていることが知られている。一方で、軟骨細胞が形成している関節軟骨の損傷は、変形性関節症などの疾患においてその病態の進展を促す重要な因子であると考えられている。こうした軟骨細胞が生体内で果たす役割の重要性にもかかわらず、未分化間葉系細胞から軟骨細胞への分化調節機構は全く解明されていない。
15

一方、軟骨細胞と同様に未分化間葉系細胞に起源を有する脂肪細胞は、細胞質内に脂肪滴を蓄積することで生体内のエネルギー供給の調節に重要な働きを有することが知られている。言うまでもなく脂肪細胞における過剰な脂肪の蓄積は肥満を生じ、多くの成人病に対する危険因子として捉えられている。脂肪細胞の分
20 化機構は、プロスタグランジン J_2 を生理的リガンドとする核内受容体である PPAR- γ 2 や、転写因子である C/EBP- α 等によって調節されることが報告されているが、全容が解明されているとは言えない。

ここで、未分化間葉系細胞とは、一般的に複数の分化能を有する未分化な間葉系細胞を指すが、中でも特に多分化能を有する中胚葉由来の細胞を意味する。具
25 体的な例としては、マウス胎児由来の C3H10T1/2 (Cell, 17:771-779, 1979) や、ラット胎仔由来の RCJ3.1 (J. Cell. Bio., 106:2139-2151, 1988) や、ラット新生仔由来の ROB (Calcif. Tissue Int. 49 (3): 221-225, 1991) などがある。

991) などが知られている。

このような未分化間葉系細胞からの軟骨細胞および脂肪細胞への分化調節機構の研究に有用と考えられる、軟骨および脂肪細胞への分化能を有する細胞株は、胎児 (Cell, 17, 771 (1979)) や腫瘍 (J. Cell Biol. 130, 1461 (1995))、新生動物 (J. Cell Biol. 106, 2139 (1988)) などに由来するものが知られているが、正常な成熟動物に由来するものは現在のところ知られていない。

こうした状況において、正常な成熟マウスなどの正常成熟動物から、軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立することができれば、成熟した個体におけるこれらの細胞の分化調節機構の研究に極めて有用な研究手段を提供できると考えられる。

発明の開示

本発明の目的の一つは、正常な成熟動物から軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる未分化間葉系細胞のクローン化細胞株を樹立することである。

本発明の別の目的は、上記の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするための方法確立することである。

本発明のさらに別の目的は、上記の細胞株を含む、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするためのキットを提供することである。

本発明のさらに別の目的は、上記のような細胞株を用いるスクリーニング法により得られることのできる、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）、並びに上記の分化調節物質を含有する医薬を提供することである。

本発明者は、上記の課題を解決するために鋭意研究した結果、正常な成熟マウスの下腿骨よりクローン化細胞株を樹立することに成功した。そして、このクロ

ーン化細胞株の性状を詳細に解析した結果、この細胞株は軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有することが明らかになり、本発明を完成するに至った。

そして、ヒトTGF- β_1 などの軟骨誘導物質に対するこの細胞株の反応性を検討した結果、この細胞株を用いて *in vitro* で簡便に軟骨誘導物質をスクリーニングすることができることが判明した。

同時に、1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃によってこの細胞株の石灰化が抑制されることが明らかになり、この細胞株が軟骨の石灰化を抑制する物質を *in vitro* で簡便にスクリーニングできることも判明した。

また、ヒトTGF- β_1 によってCL-1細胞が形成する軟骨様組織が炎症性サイトカインであるIL-1やTNF- α によって破壊されることも判明し、この細胞株を用いて、こうした軟骨破壊を抑制する物質を *in vitro* で簡便にスクリーニングできることも明らかとなった。

さらに、1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃はこの細胞株の脂肪細胞への分化を顕著に抑制することが判明し、この細胞株を用いて *in vitro* で簡便に脂肪化抑制物質をスクリーニングすることができることが判明した。

即ち、本発明の第1の側面によれば、正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株が提供される。

上記細胞株の一つの実施態様においては、正常成熟マウスに由来する細胞株が提供される。

上記細胞株の一つの実施態様においては、未分化間葉系細胞に由来する細胞株が提供される。

上記細胞株の一例としては、受託番号FERM BP-5823を有する細胞株が挙げられる。

本発明の第2の側面によれば、上記の本発明の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするための方法が提供される。

上記スクリーニング法の一つの実施態様においては、スクリーニングされる物質は遺伝子である。

本発明の第3の側面によれば、上記の本発明の細胞株を含む、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするためのキットが提供される。

5 本発明の第4の側面によれば、上記した本発明の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることのできる細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）、並びに上記分化調節物質を含有する医薬が提供される。本願発明による分化調節物質を含有する医薬の具体的用途の例としては、
10 変形性関節症治療薬、軟骨を含む組織の修復剤、リュウマチ治療薬、椎間板ヘルニア治療薬、抗肥満薬などが挙げられる。

図面の簡単な説明

15 図1は、CL-1細胞を4週間培養したときのアルシアンブルー（pH 1.0）とオイルレッドOの2重染色標本を示す写真である。

図2は、CL-1細胞を β グリセロリン酸で4週間培養したときのアリザリンレッドS染色標本を示す写真である。図2中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、bは10 mMの β グリセロリン酸存在下で
20 コンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示す。

25 図3は、II型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図3中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

図4は、X型コラーゲン特異的プライマーを用いたRT-PCRの結果を示す写真である。図4中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全RNA；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全RNA；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全RNA；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全RNAを示す。

図5は、アグリカンコア蛋白特異的プライマーを用いたR T - P C Rの結果を示す写真である。図5中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全R N A；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全R N A；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全R N A；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全R N Aを示す。

図6は、R T - P C Rに用いた特異的プライマーの塩基配列を示す。

図7は、P P A R - γ 2特異的プライマーを用いたR T - P C Rの結果を示す写真である。図7中、レーンaはサブコンフルエント培養から抽出した全R N A；レーンbはコンフルエント後1週間培養から抽出した全R N A；レーンcはコンフルエント後2週間培養から抽出した全R N A；およびレーンdはコンフルエント後4週間培養から抽出した全R N Aを示す。

図8は、C L - 1細胞により形成された結節内部のC L - 1細胞の透過型電子顕微鏡像（拡大倍率4000倍）を示す写真である。

図9は、h T G F - β_1 によるC L - 1細胞のアルシアンブルー（p H 1. 0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

図10は、h I G F - IによるC L - 1細胞のアルシアンブルー（p H 1. 0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

図11は、h T G F - β_1 の連日添加によるC L - 1細胞のアルシアンブルー（p H 1. 0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

図12は、h I G F - Iの連日添加によるC L - 1細胞のアルシアンブルー（p H 1. 0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

図13は、h T G F - β_1 またはh I G F - IによるC L - 1細胞のアルシアンブルー陽性結節形成の変化を示す写真である。図13中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したC L - 1細胞を示し、bはh T G F - β_1 （1. 0 n g / m l）でコンフルエント後3週間培養したC L - 1細胞を示し、cはh I G F - I（100 n g / m l）でコンフルエント後3週間培養したC L - 1細胞を示す。

図14は、h T G F - β_1 連日添加によるA T D C - 5細胞層のアルシアンブルー（p H 1. 0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

図15は、 $hTGF-\beta_1$ によって増加したCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性のmIL-1 α による変化を示すグラフである。

5 図16は、 $hTGF-\beta_1$ によって増加したCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性のmTNF- α による変化を示すグラフである。

図17は、 $hTGF-\beta_1$ とmIL-1 α を同時に添加したときのCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

10 図18は、 $hTGF-\beta_1$ とmTNF- α を同時に添加したときのCL-1細胞層のアルシアンブルー（pH1.0）に対する染色性の変化を示すグラフである。

15 図19は、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃によるCL-1細胞の脂肪細胞への分化抑制を示す写真である。図19中、aは培地のみでコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示し、bは1,25-ジヒドロキシビタミンD₃（ $10^{-7}M$ ）存在下でコンフルエント後3週間培養したCL-1細胞を示す。

図20は、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃によるCL-1細胞層へのCa沈着量の変化を示すグラフである。

20 図21は、 $TGF-\beta_1$ 添加による、CL-1細胞の³⁵S標識硫酸の取り込み量の変化を示すグラフである。

発明を実施するための好適な形態

本発明の細胞株の一つの特徴は、正常成熟動物に由来することである。

25 本明細書中において「正常成熟」という用語は、胎児由来の細胞、腫瘍細胞または新生動物由来の細胞などを排除するために用いられるものであり、広い意味に解釈されるものである。

本明細書中において「動物」という用語は、任意の動物の意味をし、例えば、哺乳類、ハ虫類、両生類、魚類、特には哺乳動物をさし、哺乳動物の具体例としては、マウス、ラット、ヒト、サル、ハムスターなどが挙げられ、好ましくはマ

ウスである。

本発明の細胞株は、上記の動物の多様な部位、例えば、下腿骨、大腿骨、頭蓋骨、気管、耳介、鼻、椎間板、心臓などから樹立することができる。

より具体的には、生体試料を切り出し、血清および抗生物質などを適宜補充した適当な培地中で適当な期間（例えば、9～15日間）、培養する。その後、クローニング性に増殖してくる細胞集落を単離し、培養を継続する。さらに細胞が増殖した後、継代を適当な回数（例えば10～12回）繰り返す。最後に、限界希釈法などのような細胞のクローニングのために当業者に既知の適当な技術を用いて細胞のクローニングを行うことにより、クローン化した細胞株を樹立することができる。

本発明の細胞株のもう一つの特徴は、軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有するということである。

細胞が軟骨細胞に分化したかどうかは、幾つかの試験により判断することができる。例えば、L-アスコルビン酸を含む培地中で培養した細胞をアルシアンブルー（pH 1.0）で染色した場合に染色される結節を形成するか否かにより、軟骨細胞への分化の有無を判断することができる。ここで使用されるアルシアンブルーは銅フタロシアニンの誘導体である色素であり、カルボキシル基を有する酸性多糖（ポリアニオン）を染色できるので、組織化学において広く酸性ムコ多糖（グリコサミノグリカン）の検出およびシアル酸含有糖タンパク質の組織内分布の検出に用いられている。あるいは、成熟動物より分離した初代培養軟骨細胞基質とくにプロテオグリカンの合成能を評価する際に汎用されている、³⁵S 標識硫酸を含む培地中で培養した後の³⁵S 標識硫酸の細胞層への取り込み量（Calcif. Tissue Int. 19, 179-187, 1975）を指標に、細胞が軟骨細胞に分化したかどうかを判断することもできる。

あるいはまた、細胞におけるⅠⅠ型コラーゲン、X型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白の発現の有無により、軟骨細胞への分化の有無を判断することができるし、細胞の結節の内部の超微細構造を、例えば透過型電子顕微鏡などを用いて詳細に観察することなどによっても、軟骨細胞への分化の有無を判断することができる。

一般的には、軟骨細胞への分化の有無の判断は、上記したような試験を複数組み合わせて行い、その結果を総合的に考慮して判断される。しかしながら、軟骨細胞への分化の有無を判断するために、上記以外の試験を行うことも可能であるものと理解されるべきである。例えば、トルイジンブルー染色によって結節の異染色性の観察などである。

細胞が脂肪細胞に分化したかどうか、幾つかの試験により判断することができる。例えば、オイルレッドOに染色される細胞質内脂肪滴の蓄積が認められるか否かにより脂肪細胞への分化の有無を判断することができる。あるいは、P P A R - γ_2 の発現の有無により、脂肪細胞への分化の有無を判断することができる。

軟骨細胞への分化の有無の判断と同様に、脂肪細胞への分化の有無の判断も、上記したような試験を組み合わせを行い、その結果を総合的に考慮して判断することができる。しかしながら、脂肪細胞への分化の有無を判断するためには、上記以外の試験を行うことも可能であるものと理解されるべきである。例えば、スダン I I I 染色に染色される細胞質内脂肪滴の蓄積の有無や、a P 2 およびアジプシンの発現の有無の検討などである。

本発明の細胞株の培養条件は、特に限定されず、細胞が死滅せずに生存または増殖できるような任意の条件下で培養することができる。例えば、培養温度は、一般的には33～39℃で、好ましくは37℃である。培養培地は、ウシ胎児血清、好ましくは非働化ウシ胎児血清（熱処理することにより、補体を不活化したウシ胎児血清）を3～10%（好ましくは10%）含む α -MEM培地を用いる。通気は、5%CO₂を含む空気とし、湿度は80～120%（好ましくは100%）に保って培養を行う。

本細胞株の保存条件も特に限定されないが、例えば、10%グリセリンあるいは10%ジメチルスルホキシドおよび10%血清を含む培地中に10²～10¹⁰、好ましくは10⁴～10⁸、さらに好ましくは10⁶個/mlの細胞濃度で浮遊させた状態で、-80℃あるいは液体窒素中で凍結保存することができる。好ましくは、10%グリセリンおよび10%血清を含む培地中で10⁶個/mlの細胞濃度で浮遊させた状態で、液体窒素中で凍結保存する。

上記のように保存された細胞株は、例えば、37℃の水浴で急速に溶解した後、10倍量の10%血清を含む培地を添加して攪拌し、遠心分離して回収した細胞を10%血清を含む培地で培養することにより再び増殖させることができる。

本発明の第2の側面によれば、本発明の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）をスクリーニングするための方法が提供される。

本明細書中において、「細胞の分化調節物質」とは、細胞の分化の調節に関与する任意の物質を意味し、その例としてはヒト骨髓性白血病細胞株HL-60に対して、それぞれマクロファージまたは顆粒球に分化させることが知られている1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃や全トランスレチノイン酸などが挙げられる。本発明の細胞株においては、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質などが含まれる。これらの例としては、軟骨細胞への分化の促進因子としてのヒトTGF- β_1 およびヒトインシュリン様増殖因子-I、脂肪細胞分化の促進物質としてのヒトインシュリン様増殖因子-I、脂肪細胞分化の抑制物質としてのヒトTGF- β_1 および1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃、軟骨組織の破壊を促進する物質としてのIL-1およびTNF- α 、軟骨細胞の石灰化を抑制する因子としての1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃がそれぞれ挙げられる。

本明細書中において、「軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質」とは、未分化細胞、例えば未分化間葉系細胞から、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を誘導または抑制する物質を意味する。

軟骨細胞への分化を調節する物質の例としては、軟骨誘導能を有することが知られているヒトトランスフォーミング成長因子 β_1 および軟骨細胞に対する細胞外基質産生促進作用を有することが知られているヒトインシュリン様増殖因子-Iなどが挙げられる。

脂肪細胞への分化を調節する物質の例としては、脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞に対してその脂肪化を抑制することが知られている1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃および脂肪細胞に対する脂肪合成促作用を有することが知られてい

るヒトインシュリン様増殖因子－Iなどが挙げられる。

本明細書中において、「軟骨組織の破壊を調節する物質」とは、軟骨組織、例えば軟骨形成能を有する細胞を一定条件下で培養した場合に形成される軟骨組織に対して、当該組織の破壊を調節する物質、特に当該組織の破壊を促進または抑制する物質を意味する。

軟骨組織の破壊を促進する物質の具体例としては、炎症性のサイトカインであるIL－1またはTNF－ α などが挙げられる。

本明細書中において、「軟骨細胞の石灰化を調節する物質」とは、軟骨細胞の石灰化を促進または抑制する物質を意味し、特に石灰化を抑制する物質を意味する。細胞の石灰化は、例えば、細胞中のCa含量を測定することにより評価することができる。軟骨細胞の石灰化を抑制する物質の例としては、1, 25－ジヒドロキシビタミンD₃などが挙げられる。

後記の実施例で実証されるように、本発明の細胞株は、上記に挙げた物質を用いた場合、軟骨細胞および脂肪細胞への分化の有無、軟骨組織の破壊の程度および軟骨細胞の石灰化の程度を評価できる細胞株であると言えることから、本発明の細胞株を用いて、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質をスクリーニングすることができることは明らかである。

また、スクリーニングされる物質の対象としては、それ自体で分化調節能力を有する生理活性物質のみならず、分化調節に何らかの形式で関与する遺伝子も含まれる。

例えば、本明細書中上記した通り、本発明の細胞株は軟骨細胞への分化に伴って、I型コラーゲン、X型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白のmRNAを発現しており、これらのmRNAは、以下の実施例に記載されているRT－PCR法や公知のTMA法（Transcription Mediated Amplification, 特表平4－500759号）などのようなmRNAの検出のために当業者に慣用される技術により検出することができる。RT－PCR法を使用する場合には、軟骨細胞への分化に関与することが推定される遺伝子の配列に特異的なPCR用プライマーを設計し、このプライマーを用いてRT－PCR法を実施することにより、軟骨細

胞への分化に関与する遺伝子を単離することが可能である。

これら遺伝子の単離には、他にも発現クローニング法などを用いることもできる。例えば、本発明の細胞から抽出したmRNAから2本鎖cDNAライブラリーを作成し、これらのcDNAを適当なベクターに組み込み、適当な動物細胞に遺伝子導入し、cDNAを発現させる。これらの細胞を軟骨細胞分化の適当な指標、例えばアルシアンブルー染色性などでスクリーニングすることにより、軟骨細胞の分化に関わる遺伝子を単離することができる。

また、軟骨細胞の分化との関連の有無にかかわらず、既知の遺伝子の塩基配列をもとにPCR法を用いて遺伝子を単離することもできる。例えば、既知の遺伝子と類似の遺伝子の塩基配列から、適当なプライマーを設計し、本発明の細胞から抽出したmRNAから作成したcDNAライブラリーを用いて適当な条件下でPCRを行うことで既知の遺伝子と類似性の塩基配列を有する遺伝子を増幅、単離することができる。

同様に、本発明の細胞株は脂肪細胞への分化に関与することが知られているPPAR- γ_2 のmRNAを発現しており、このmRNAはRT-PCR法や公知のTMA法などのようなmRNAの検出のために当業者に慣用される技術により検出することができる。RT-PCR法を使用する場合には、脂肪細胞への分化に関与することが推定される遺伝子の配列に特異的なPCR用プライマーを設計し、このプライマーを用いてRT-PCR法を実施することにより、脂肪細胞への分化に関与する遺伝子を単離することが可能である。

これら遺伝子の単離には、他にも発現クローニング法などを用いることもできる。例えば、本発明の細胞から抽出したmRNAから2本鎖cDNAライブラリーを作成し、これらのcDNAを適当なベクターに組み込み、適当な動物細胞に遺伝子導入し、cDNAを発現させる。これらの細胞を脂肪細胞分化の適当な指標、例えば細胞内脂肪滴の蓄積などでスクリーニングすることにより、脂肪細胞の分化に関わる遺伝子を単離することができる。

また、脂肪細胞の分化との関連の有無にかかわらず、既知の遺伝子の塩基配列をもとにPCR法を用いて遺伝子を単離することもできる。例えば、既知の遺伝子と類似の遺伝子の塩基配列から、適当なプライマーを設計し、本発明の細胞か

ら抽出したmRNAから作成したcDNAライブラリーを用いて適当な条件下でPCRを行うことで既知の遺伝子と類似性の塩基配列を有する遺伝子を増幅、単離することができる。

5 さらに本発明によれば、本発明の細胞株を含む、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質をスクリーニングするためのキットが提供される。

本キット中において、本発明の細胞株は、好ましくは、容易に培養増殖可能な状態に回復できるような形態で保持されている。例えば、10%グリセリンおよび10%血清を含む培地中で凍結保存した状態や、培養用のフラスコで培養してある状態などである。

本キットには通常、本発明の細胞株に加えて、スクリーニングの目的とされる物質の作用によって生じるであろう当該細胞株の性質の変化を検出するための試薬、および場合によっては、細胞株の培養の際に培地に添加すべき特定の試薬などが含まれる。

15 例えば、軟骨誘導物質をスクリーニングするためのキットまたは軟骨破壊抑制物質をスクリーニングするためのキットの場合には、検出試薬としてはアルシアンブルー（pH 1.0）、³H標識グルコサミンあるいは³⁵S標識硫酸などを使用することができる。

20 また、脂肪細胞分化調節物質をスクリーニングするためのキットの場合には、検出試薬としてはオイルレッドO、スダンIII、トリグリセリド定量のための試薬などを使用することができる。

さらにまた、本発明によれば、本発明の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることができる細胞の分化調節物質（例えば、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質）が提供される。これらの物質の種類は特には限定されず、本発明のスクリーニング法においてスクリーニングされた任意の物質（遺伝子などを含む）が含まれる。

これらの物質の中には、関節や耳、鼻の軟骨の修復、再建や、関節軟骨の石灰化抑制による関節機能の維持や、関節の炎症における関節軟骨破壊の抑制、ある

いは肥満の治療などの分野において有用な治療薬剤として使用できるものが含まれる。

実施例

5 本発明を以下の実施例によって例示的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例 1 : クローン化細胞株の樹立

正常成熟マウス下腿骨由来細胞株は、5 週齢の C 5 7 B L / 6 マウスの下腿骨近位端から樹立された。

10 すなわち、マウス下腿骨を無菌的に摘出後近位端を切り出し、6 穴プレート (C O R N I N G 社製) 中で 1 0 % 非働化血清 (F B S)、1 0 0 U / m l ペニシリンおよび 1 0 0 μ g / m l ストレプトマイシンを添加した α M E M 培地 (G I B C O 社製) で 9 日間培養した。培地交換後さらに 4 日間培養した。

15 その後、クローン性に増殖している細胞集落を 0. 0 5 % トリプシン + 0. 0 2 % E D T A (S i g m a 社製) に浸した濾紙片で単離し、濾紙片ごと 2 4 穴プレート (C O R N I N G 社製) で培養した。培地交換は 3 日ごとに行った。濾紙片の培養開始から 7 日目に細胞がコンフルエントに達したのを確認後、C a - M g を含まない P B S と 0. 0 5 % トリプシン + 0. 0 2 % E D T A を用いて細胞を剥離し、6 0 m m 皿 (C O R N I N G 社製) に継代した。3 日ごとに培地を交換し、継代後 6 日で 4 倍の希釈倍率で細胞を継代した。以後同様にして 1 6 回まで細胞を継代し、1 6 回目の細胞を限界希釈法を用いて細胞のクローニングを行い、クローン化細胞株である C L - 1 細胞を樹立した。

20 上記で得られた C L - 1 細胞は、日本国茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号の工業技術院生命工学工業研究所に、1 9 9 7 年 2 月 1 8 日に受託番号 F E R M B P - 5 8 2 3 の下、寄託された。

実施例 2 : C L - 1 細胞の特性

前記の如くして樹立された C L - 1 細胞について、i n v i t r o での結節形成能を検索すると共に、R T - P C R 法を用いて I I 型コラーゲン、X 型コラ

ーゲン、アグリカンコア蛋白およびP P A R - γ_2 のmRNA発現の有無の検討を行い、また透過型電子顕微鏡を用いた超微細構造の観察を行った。

CL-1細胞を50 μ g/mlのL-アスコルビン酸（和光純薬社製）を添加した培地で1カ月間培養した。その後、4%パラホルムアルデヒド（pH 7.4）で固定し、0.1 N塩酸で洗浄後、1%アルシアンブルー（EM Science社製）溶液（pH 1.0）で1時間染色し、0.1 N塩酸で分別後、光学顕微鏡下で観察した。その結果、アルシアンブルー（pH 1.0）に染色される結節が形成された（図1を参照）。

また、培地に10 mMの β グリセロリン酸を添加してCL-1細胞を同様に培養した。その後、4%パラホルムアルデヒド（pH 7.4）で固定し、蒸留水で洗浄後、1%アリザリンレッドS（Merck社製）溶液で5分間染色し、水洗後、肉眼的および光学顕微鏡的に観察した。その結果、結節はアリザリンレッドSに陽性を示すようになった（図2を参照）。

また、結節を形成しない部位では、オイルレッドO（プロピレングリコール中の濃度0.5%）に染色される細胞質内脂肪滴の蓄積が認められた（図1を参照）。

また、CL-1細胞の結節形成の過程におけるI I型コラーゲン、X型コラーゲンおよびアグリカンコア蛋白のmRNA発現を、RNA PCRキット（宝酒造社製）およびこれらに特異的な塩基配列を有するプライマー（図6および配列表を参照）を用いてRT-PCR法で解析した。なお、図6中のI I型コラーゲンの検出用のプライマーの配列は配列番号1および2に；図6中のX型コラーゲンの検出用のプライマーの配列は配列番号3および4に；図6中のアグリカンコア蛋白の検出用のプライマーの配列は配列番号5および6にそれぞれ記載されている。RT-PCRは、CL-1から抽出した総RNAをDNase I（宝酒造社製）処理後、キットの説明書に従って試薬を添加し、逆転写反応を行い、それに引き続いてPCRを行った。PCRは、94℃での1分間の処理を1回行い、94℃で1分間、57℃で2分間そして72℃で3分間のサイクルを40回行い、最後に72℃で7分間の処理を1回行い、4℃に冷却する条件で行った。

その結果、上記全てのmRNAについてその発現が認められた（図3から図5

を参照)。

一方、PPAR- γ_2 のmRNAの発現も同様にプライマー(図6および配列表を参照)を用いてRT-PCR法で解析した。図6中のPPAR- γ_2 の検出用のプライマーの配列は配列番号7および8に記載されている。その結果、PPAR- γ_2 の発現も認められた(図7を参照)。

さらに、CL-1細胞の結節を透過型電子顕微鏡を用いて結節内部の超微細構造を観察したところ、軟骨細胞に類似した細胞形態と細胞間基質の構造が認められた(図8を参照)。

これらの結果から、CL-1細胞は軟骨および脂肪細胞への分化能を有する間葉系細胞であることが明らかとなった。

さらに、CL-1細胞を β グリセロリン酸存在下で1カ月間培養すると、CL-1細胞によって形成された結節がアリザリンレッドSに陽性であることにより、CL-1細胞より生じた軟骨様細胞は、軟骨の最終分化段階である石灰化軟骨にまで分化できることも判明した。

実施例3: CL-1細胞を用いた *in vitro*での軟骨誘導能の評価

CL-1細胞を *in vitro*の軟骨誘導物質のスクリーニング系として利用できるかどうかを検討するために、軟骨誘導能が知られているhTGF- β_1 (J. Biol. Chem. 261, 5693 (1986))に関して、CL-1細胞のアルシアンブルー(pH 1.0)に対する染色性への作用を検討した。すなわち、CL-1細胞を2500細胞/cm²の細胞密度で24穴プレート(CORNING社製)で培養し、コンフルエントに達した時点でヒトトランスフォーミング成長因子- β_1 (hTGF- β_1 ; AUSTRAL Biologicals社製)を0.1、1.0、10 ng/mlの濃度で添加し、2ないし3日ごとに培地交換して、添加開始後3週間培養した。hTGF- β_1 の添加は、培地交換ごとに実施した。培養終了後、細胞を4%パラホルムアルデヒド(和光純薬社製)で固定し、水洗後0.1N塩酸(和光純薬社製)で3分処理後、アルシアンブルー(pH 1.0)溶液(濃度: 1%)で一晩染色した。染色終了後、サンプルを蒸留水で3回洗浄し、風乾した。乾燥したサンプルを300 μ lの6Mグアニジン塩酸溶液(和光

純薬社製)に3時間浸漬し、攪拌後グアニジン塩酸溶液の620nmにおける吸光度を測定した。その結果、hTGF- β_1 の用量依存的にアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性は増加した(図9を参照)。

5 軟骨細胞に対する細胞外基質産生促進作用が知られている(Ann. Rev. Physiol. 47, 443 (1985))ヒトインシュリン様増殖因子-I(hIGF-I; CHEMICON INTERNATIONAL社製)についても同様の検討を行ったところ、100ng/mlでアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性の増加が認められた(図10を参照)。

10 また、CL-1細胞がコンフルエントに達した後にhTGF- β_1 (図11を参照)あるいはhIGF-I(図12を参照)を5ないし7日間連日添加した場合にも同様の結果が得られた。

形態学的にもhTGF- β_1 およびhIGF-Iの存在下で培養した場合、培地のみで培養した場合と比較して、アルシアンブルー(pH1.0)陽性の結節は明らかに増加していた(図13を参照)。

15 また、インシュリン存在下で軟骨細胞に分化することが知られているATDC-5細胞(Cell Diff. Dev. 30, 109 (1990); 理化学研究所細胞銀行から入手可能)についても、10 μ g/mlのインシュリンおよび0.1ないし10ng/mlのhTGF- β_1 の存在下で同様の方法でコンフルエント後7日間培養して、アルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性を検討した。その結果、hTGF- β_1 処理によって、ATDC-5細胞ではアルシアンブルー(pH1.0)に対する染色性は用量依存的に低下した(図14を参照)。

20 これらの結果から、CL-1細胞が*in vitro*で軟骨形成を評価できる有用な細胞株であることが明らかになった。

25 実施例4: CL-1細胞を用いた*in vitro*での軟骨破壊評価系の構築

CL-1細胞にhTGF- β_1 の存在下で培養することで形成される軟骨様結節が、炎症性のサイトカインであるIL-1やTNF- α によって破壊されるかどうかを検討した。CL-1細胞を2500細胞/cm²の細胞密度で24穴プレート(CORNING社製)で培養し、コンフルエントに達した時点でhTG

F- β_1 (1.0 ng/ml) の最終濃度になるよう連日5日間培地に添加した。その後、マウスインターロイキン1 α (mIL-1 α ; R&D systems社製) およびマウス腫瘍壊死因子- α (mTNF- α ; R&D systems社製) を最終濃度0.1、1.0、10 ng/mlとなるよう培地に連日5日間添加し培養した。その後に、上記と同様の方法でCL-1細胞のアルシアンブルー (pH 1.0) に対する染色性を測定した。その結果、mIL-1 α は0.1 ng/ml以上 (図15を参照)、mTNF- α は1.0 ng/ml以上 (図16を参照) でアルシアンブルー (pH 1.0) に対する染色性が低下した。また、hTGF- β_1 の添加とmIL-1 α (図17を参照) あるいはmTNF- α (図18を参照) を同時に添加しても同様の成績が得られた。

これらの結果から、CL-1細胞は炎症性サイトカインによる軟骨組織の破壊を*in vitro*で評価できる細胞株であることが明らかになった。また、このことから、本実験系を利用して軟骨破壊抑制物質の探索も可能であることが示された。

実施例5：CL-1細胞を用いた*in vitro*での脂肪細胞分化調節物質のスクリーニング

脂肪前駆細胞株3T3-L1細胞に対してその脂肪化を抑制することが知られている1,25-ジヒドロキシビタミンD₃ (Comp. Biochem. Physiol. 96A, (1990)) のCL-1細胞の脂肪細胞への分化への影響を検討した。CL-1細胞を2500細胞/cm²の細胞密度で4穴チャンバースライド (Nunc社製) で培養し、コンフルエントに達した時点で1,25-ジヒドロキシビタミンD₃を最終濃度10⁻⁷Mになるよう培地交換ごとに添加した。1,25-ジヒドロキシビタミンD₃添加開始後3週間でオイルレッドO陽性細胞内脂肪滴の蓄積を顕微鏡下で観察した。その結果、1,25-ジヒドロキシビタミンD₃はオイルレッドO陽性の細胞質内脂肪滴の蓄積を顕著に抑制していた (図19を参照)。

一方、脂肪細胞に対して脂肪合成促進作用が知られているhIGF-I (Ann. Rev. Physiol. 47, 443 (1985)) についても同様の検討を行ったところ、CL-1細胞のオイルレッドO陽性脂肪滴の蓄積は培地のみのものに比較して促進さ

れていた（図13cを参照）。

これらのことから、CL-1細胞は未分化な間葉系細胞から脂肪細胞への分化を抑制あるいは促進する物質の*in vitro*評価系として有用であることが明らかになった。

実施例6：CL-1細胞を用いた軟骨石灰化抑制物質のスクリーニング

1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃は軟骨の石灰化過程において抑制的に働くことが知られているが（Proc. Natl. Acad. Sci. 87, 6522 (1990)）、そのCL-1細胞の石灰化に対する作用を検討した。

CL-1細胞を2000細胞/cm²の細胞密度で60mm皿（CORNING社製）で培養した。コンフルエントに達した時点で1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃を最終濃度10⁻⁹、10⁻⁸および10⁻⁷Mになるように添加し、コンフルエント後4週間まで毎週サンプリングして経時的にCa含量を測定した。すなわち、細胞層をCa-Mgを含まないPBSにて3回洗浄後セルスクレイパー（Nunc社製）でつぶし回収後、60度の孵卵器中で乾燥後、オーブンで800℃で一晩燃焼し、残った灰を6N塩酸（和光純薬社製）500μlに溶解した。この溶液中のCa量を0-CPC法（Caテストワコー、和光純薬）にて定量し、皿あたりのCa沈着量を算出した。その結果、コンフルエント後2週間以降で1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃は溶媒対照群に対して有意なCa沈着量の抑制が認められた（図20を参照）。この結果から、CL-1細胞が軟骨の石灰化を抑制する物質を*in vitro*で評価できる細胞株であることが明らかになった。

実施例7：CL-1細胞を用いた*in vitro*での軟骨への分化促進活性の評価

実施例3では、アルシアンブルーに対する染色性を指標にして軟骨誘導能を評価したが、この実施例では³⁵S標識硫酸の取り込み量を指標にして軟骨への分化促進活性を評価した。

CL-1細胞を2000個/ウエルの細胞数でポリスチレン製96ウェルプレ

ート (Wallac社製) にまき、10% 非働化血清 (Intergen社製) および 100 U/ml ペニシリンおよび 100 μ g/ml ストレプトマイシンを含む α -MEM (GIBCO社製) で 37°C、5% CO₂ のインキュベーター内で培養し、コンフルエントに達するまで週 3 回新鮮培地に交換した。コンフルエントを顕微鏡下で確認後、ヒト TGF- β_1 (AUSTRAL BIOLOGICALS社製) を 0.1、1.0、10 ng/ml 含む新鮮培地に交換し、培養を続けた。その 24 時間後、³⁵S 標識硫酸 (Amersham社製) を 0.5 μ Ci/ウェル添加し、さらに 24 時間培養した。その後、5% パラホルムアルデヒド (和光純薬社製) および 0.4% セチルピリジニウムクロリド (和光純薬社製) を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) 200 μ l と交換し、室温で 2 時間固定した。同液で 1 回 CL-1 細胞層を洗浄後、液体シンチレータ (Optiphase supermix, Wallac社製) 100 μ l を各ウェルに添加後攪拌し、CL-1 細胞層が取り込んだ ³⁵S 標識硫酸の放射活性を、液体シンチレータ (Microbeta 1450, Wallac社製) で測定した。

その結果、ヒト TGF- β_1 は 0.1 ng/ml 以上で培地のみの対照と比較して統計学的に有意に ³⁵S 標識硫酸の取り込み量を増大させた。

TGF- β_1 について得られた結果を図 21 に示す。図 21 から分かるように、³⁵S 標識硫酸の取り込み量は、TGF- β_1 の添加により約 2 倍まで増加した。

なお、この ³⁵S 標識硫酸の取り込み量を指標としたこのスクリーニング法は、コンフルエント到達後 2 日間で結果が得られるという点で、アルシアンブルーに対する染色性を指標にする方法よりも時間と労力を低減できる。また、コンフルエント到達後に添加した物質の軟骨細胞への分化促進活性を、2 日間で評価できる系はこれまで報告されていないため、CL-1 細胞を使用するスクリーニング法はこれまでにない有用性を提供することになる。

産業上の利用の可能性

本発明の細胞株は、正常成熟動物に由来した、軟骨細胞および脂肪細胞に分化することができる新規な細胞株である。そして、本発明の細胞株を利用することにより、細胞の分化調節物質、例えば、軟骨細胞および脂肪細胞の分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を抑制する物質、または軟骨細胞の石灰化を調節する物

質などをスクリーニングすることができる。

さらにまた、本発明の細胞株を用いたスクリーニング法により得られる物質は、その特性を利用して、例えば、関節や耳、鼻の軟骨の修復・再建や、関節軟骨の石灰化抑制による関節機能の維持や、関節の炎症における関節軟骨破壊の抑制、
5 あるいは肥満の治療などの分野において有用な治療薬剤などとして利用しうるものである。

なお、本出願が有する優先権主張の基礎となる日本国特許出願：特願平9-70556号の内容は全て引用により本明細書の中に取り入れられるものとする。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：19

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . . 19

特徴を決定した方法：E

配列

ACACAATCCA TTGCGAACC 19

配列番号：2

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . . 20

特徴を決定した方法：E

配列

AGATAGTTCC TGTCTCCGCC 20

配列番号：3

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 1

特徴を決定した方法：E

配列

CAGCTGGCAT AGCAACTAAG G 21

配列番号：4

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 0

特徴を決定した方法：E

配列

GTGGTTAGCA CTGACAAGCG 20

配列番号：5

配列の長さ：20

配列の型：核酸

鎖の数：1本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 0

特徴を決定した方法：E

配列

TGTTCA GTGG AACAGCAACC 20

配列番号：6

配列の長さ：2 2

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置：1 . . 2 2

特徴を決定した方法：E

配列

AGATTGTTCA CTGACGTCCA CC 22

配列番号：7

配列の長さ：2 0

配列の型：核酸

鎖の数：1 本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：u n s u r e

存在位置： 1 . . 2 0

特徴を決定した方法： E

配列

CTGATGCACT GCCTATGAGC 20

配列番号： 8

配列の長さ： 2 0

配列の型： 核酸

鎖の数： 1 本鎖

トポロジー： 直鎖状

配列の種類： 他の種類 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号： u n s u r e

存在位置： 1 . . 2 0

特徴を決定した方法： E

配列

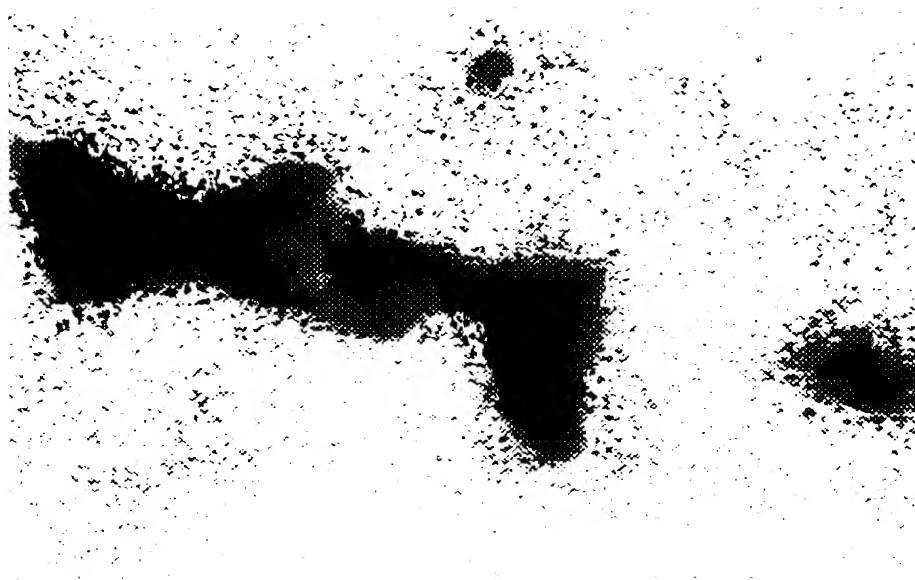
CATGAGGCCT GTTGTAGAGC 20

請求の範囲

1. 正常成熟動物に由来することを特徴とする軟骨細胞および脂肪細胞に分化する能力を有する細胞株。
2. 正常成熟動物が正常成熟マウスである、請求の範囲第1項に記載の細胞株。
- 5 3. 未分化間葉系細胞に由来する、請求の範囲第1項又は第2項に記載の細胞株。
4. 受託番号FERM BP-5823を有する請求の範囲第1項から第3項の何れかに記載の細胞株。
5. 請求の範囲第1項から第4項の何れかに記載の細胞株を用いることを特徴とする、細胞の分化調節物質をスクリーニングするための方法。
- 10 6. 細胞の分化調節物質が、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、請求の範囲第5項に記載の方法。
7. スクリーニングされる物質が遺伝子であることを特徴とする、請求の範囲
- 15 第5項または第6項に記載のスクリーニング方法。
8. 請求の範囲第1項から第4項の何れか1項に記載の細胞株を含む、細胞の分化調節物質をスクリーニングするためのキット。
9. 細胞の分化調節物質が、軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、
- 20 請求の範囲第8項に記載のキット。
10. 請求の範囲第1項から第4項の何れかに記載の細胞株を用いるスクリーニング法により得られることのできる細胞の分化調節物質。
11. 軟骨細胞または脂肪細胞への分化を調節する物質、軟骨組織の破壊を調節する物質または軟骨細胞の石灰化を調節する物質である、請求の範囲第10項
- 25 に記載の細胞の分化調節物質。
12. 請求の範囲第10項または第11項に記載の分化調節物質を含有する医薬。

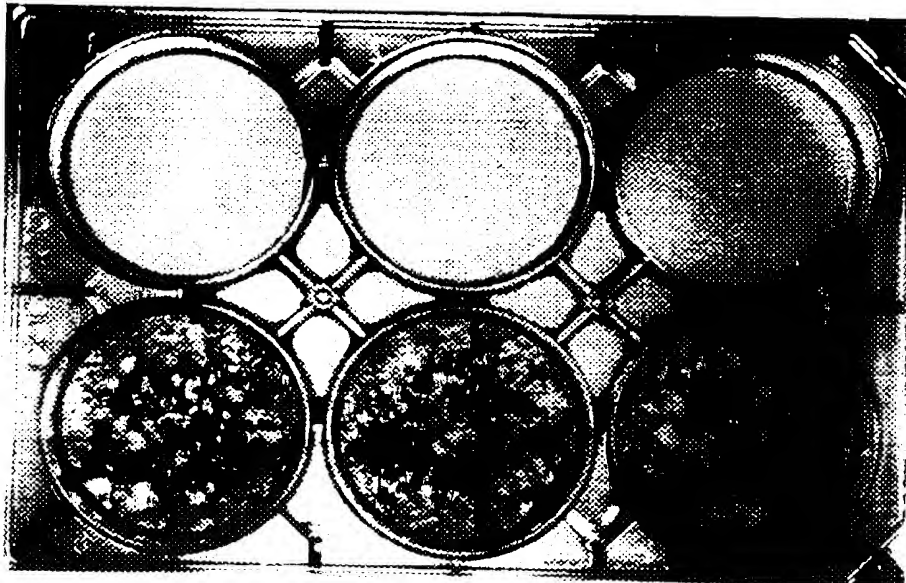
13. 変形性関節症治療薬、軟骨を含む組織の修復剤、リュウマチ治療薬、椎間板ヘルニア治療薬および抗肥満薬から成る群から選択されることを特徴とする、請求の範囲第12項に記載の医薬。

[X] 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 4



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 5



THIS PAGE BLANK (USPTO)

II型コラーゲン： 5'ACACAATCCATTGCCGAACC3' 5'AGATAGTTCCCTGTCTCCGGCC3'

X型コラーゲン： 5'CAGCTGGCATAGCAACTAAGG3' 5'GTGGTTAGCACCTGACAAGCC3'

アグリカンコア蛋白：5'TGTTTCAGTGGAAACAGCAACC3' 5'AGATTGTTCACTGACGTCCACC3'

PPAR- γ 2： 5' CTGATGCACCTGCCCTATGAGC 3' 5' CATGAGGCCCTGTGTAGAGC 3'

6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 7



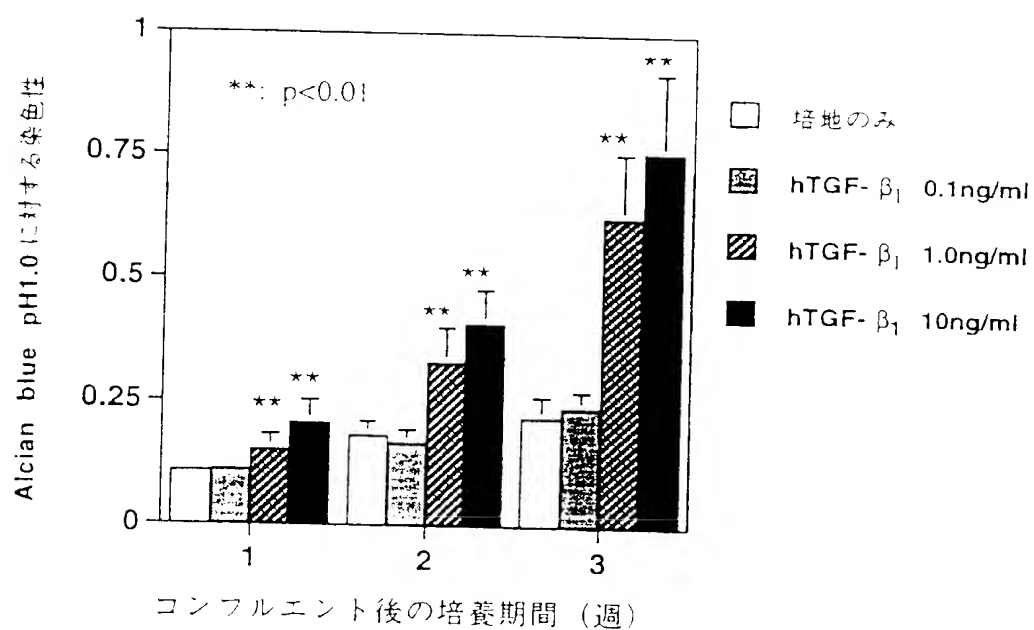
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 8



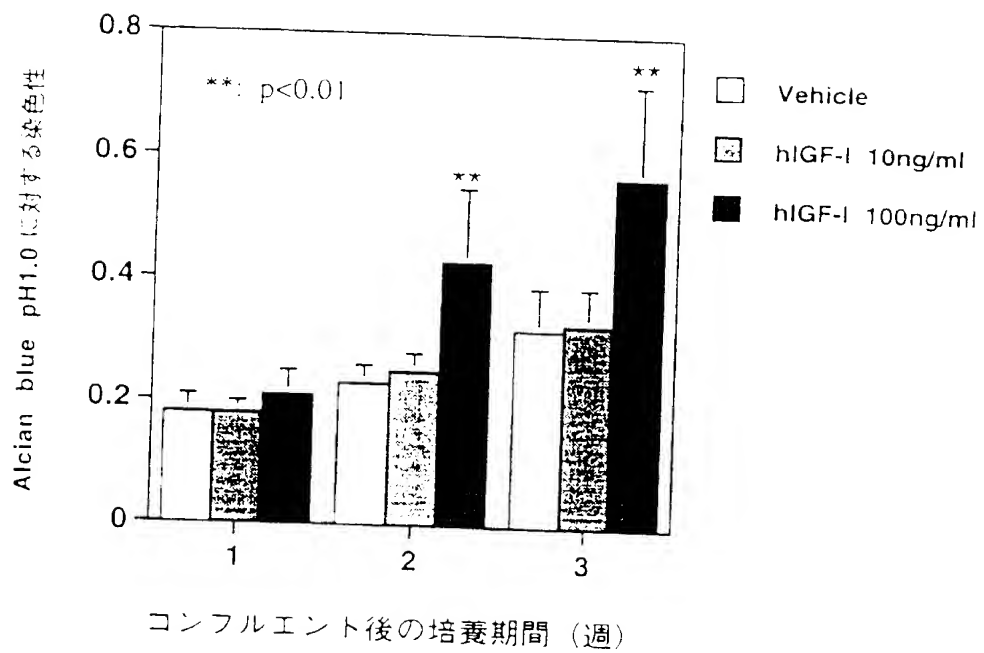
THIS PAGE BLANK (USPTO)

[図 9]



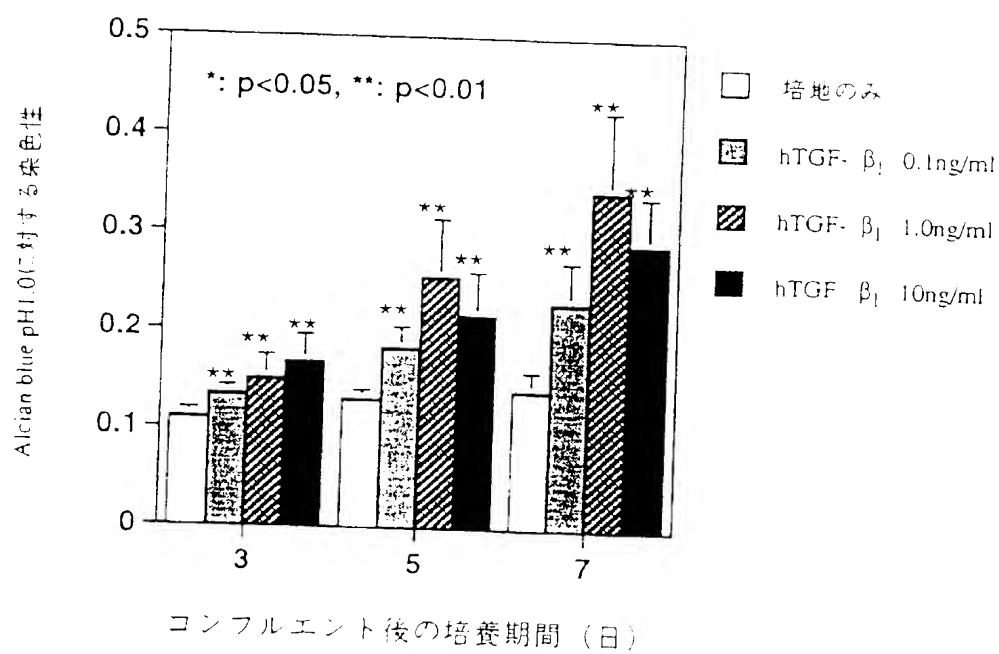
THIS PAGE BLANK (USPTO)

[図] 1 (O)



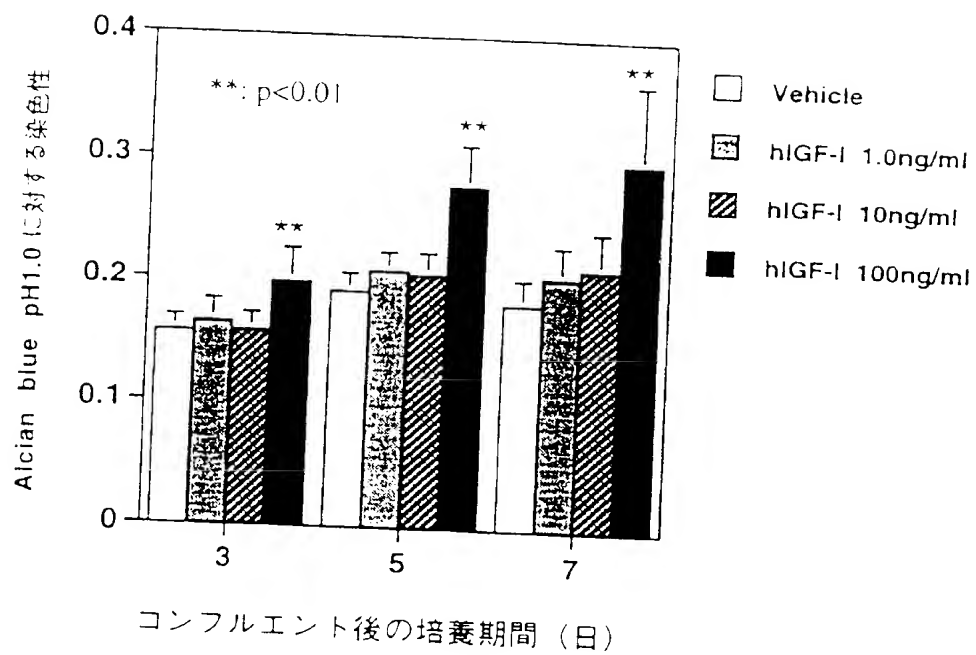
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)

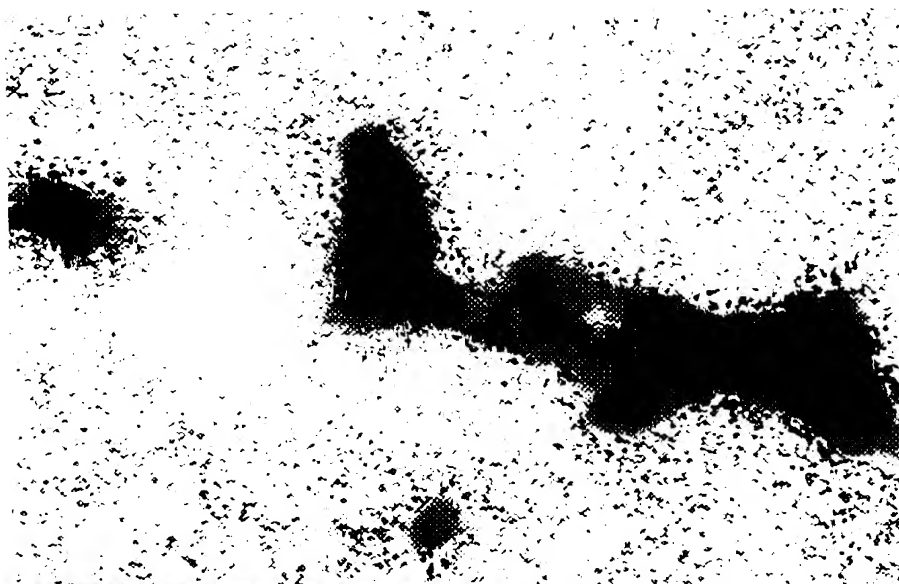
図 1 2



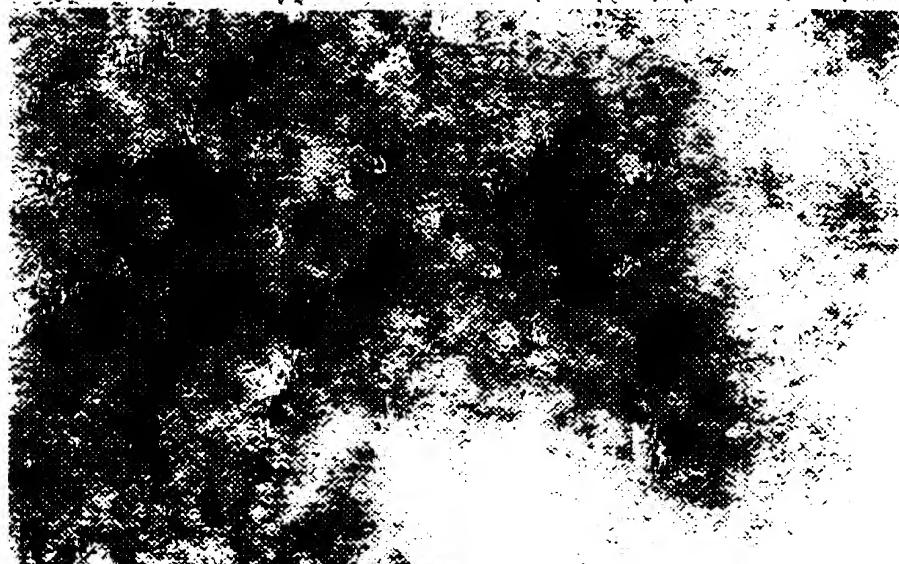
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1 3

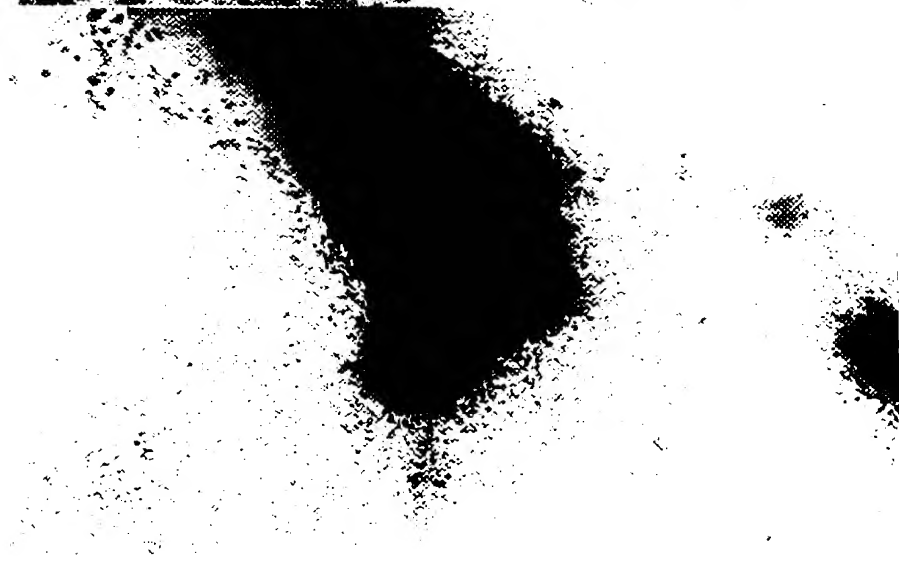
a



b

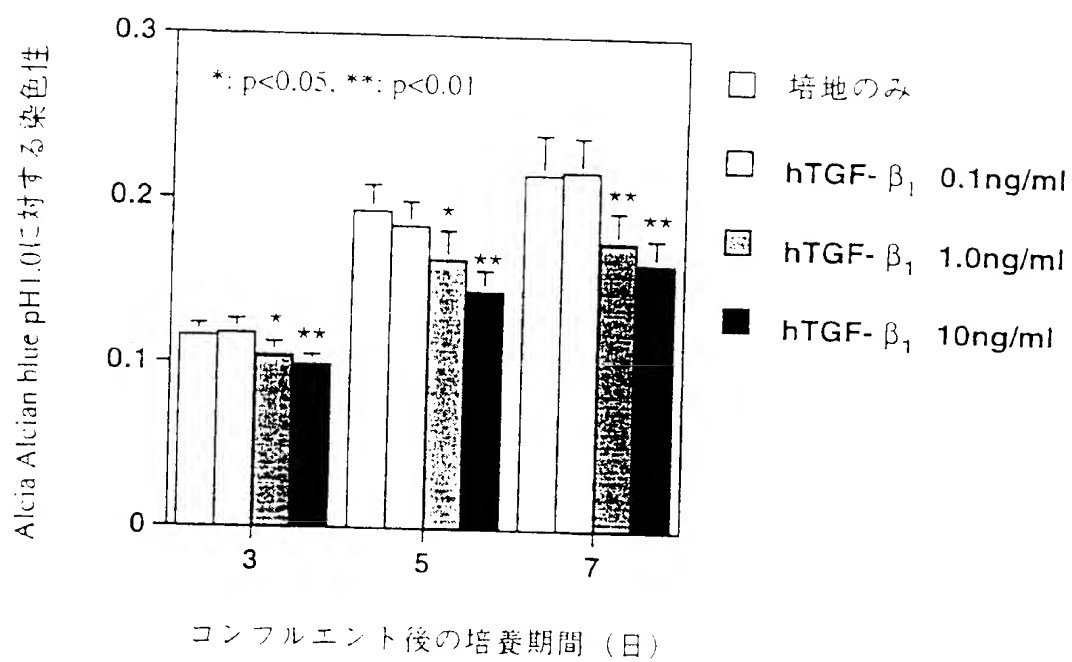


c



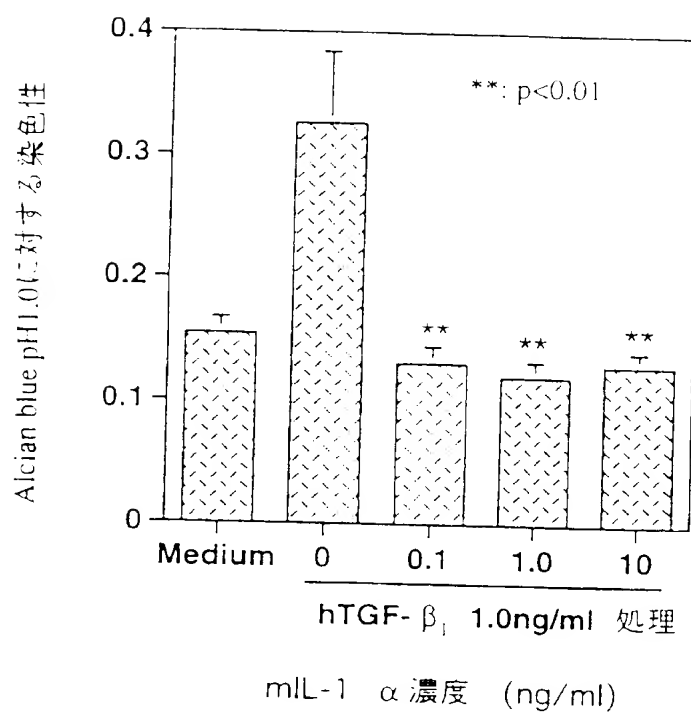
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 14



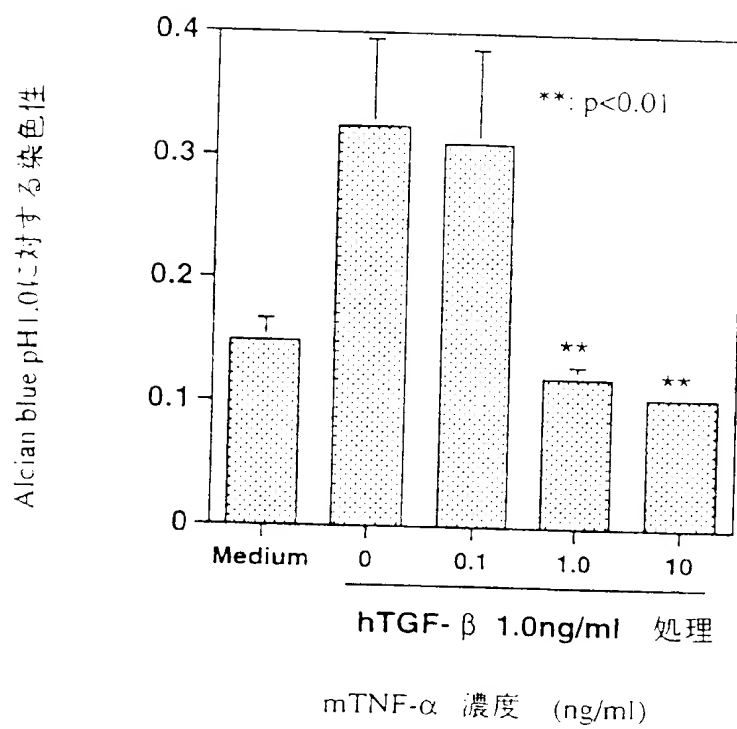
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 1. 5



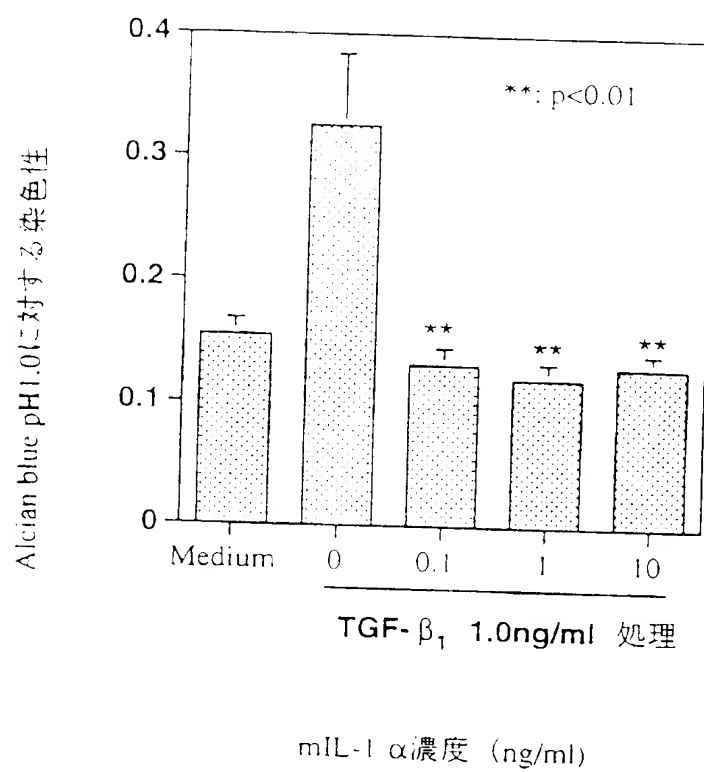
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 16



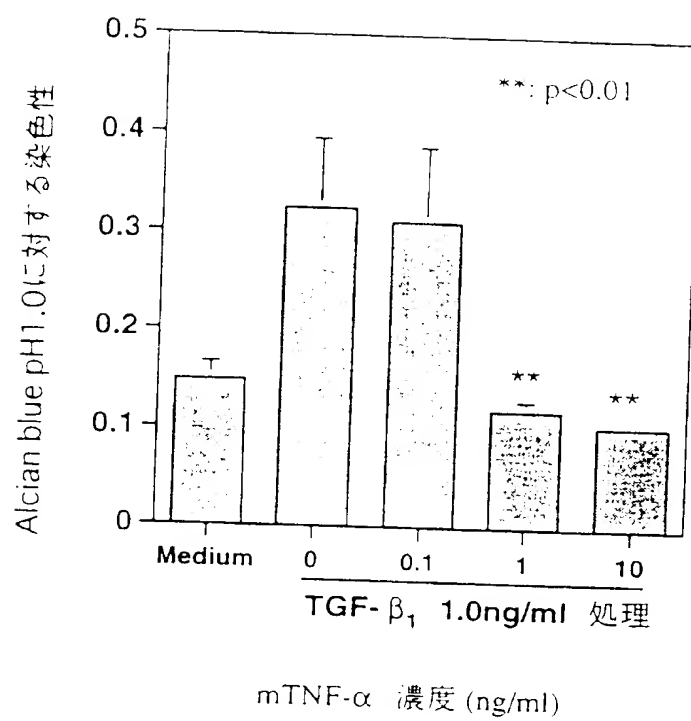
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 17



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 18



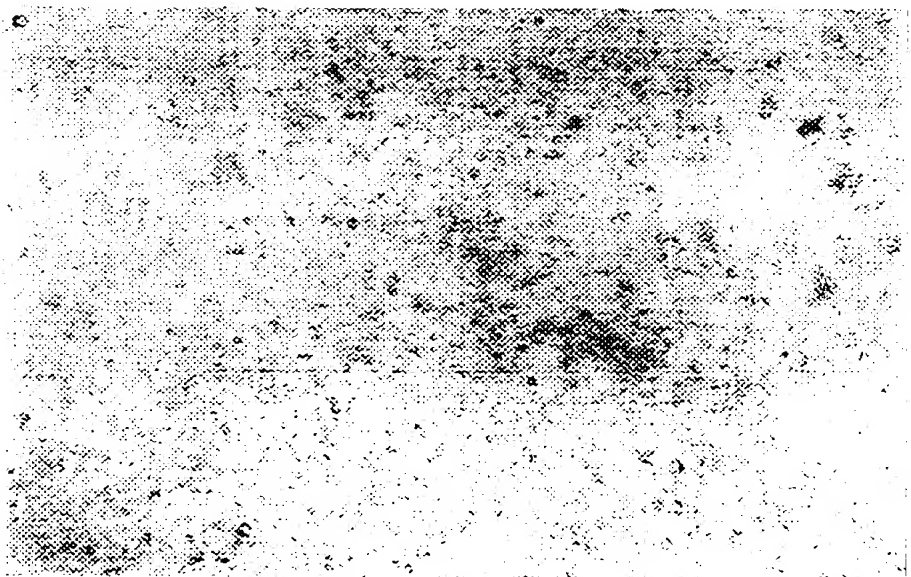
THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 19

a

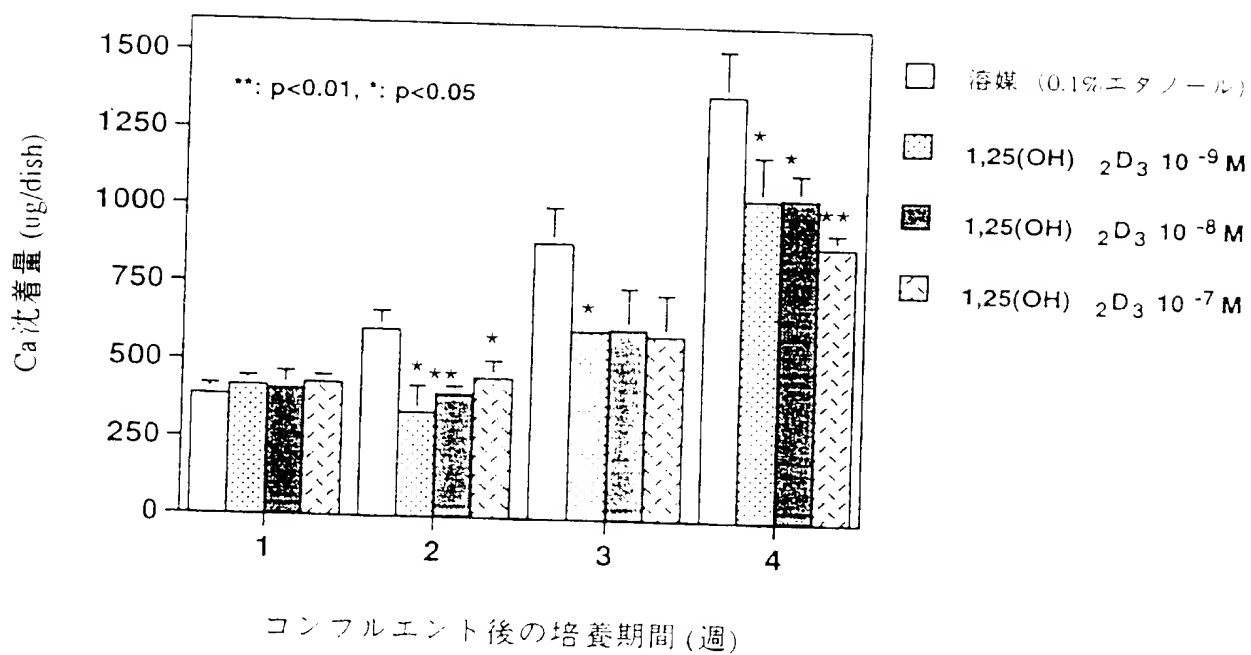


b



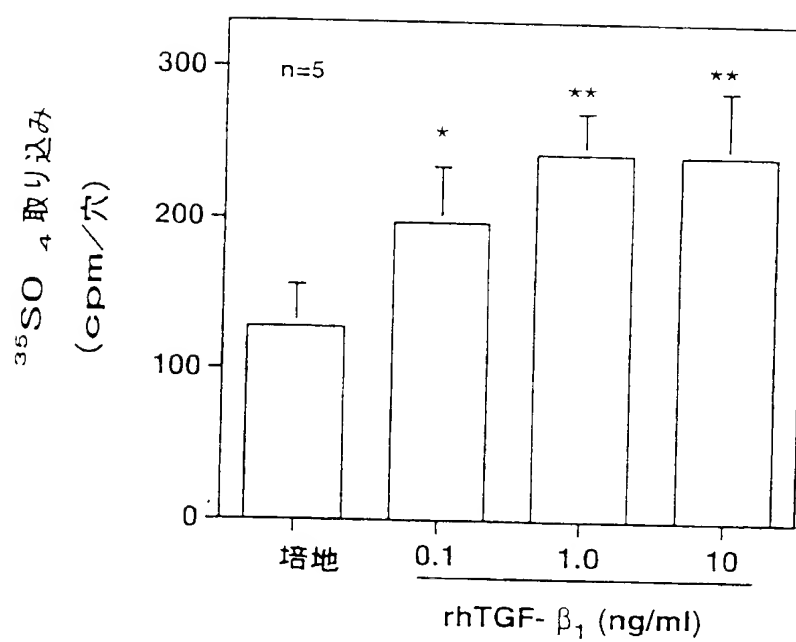
THIS PAGE BLANK (USPTO)

Figure 20 is a bar chart showing the amount of calcium (Ca) deposited (in ug/dish) over a 4-week period following confluence. The y-axis represents 'Ca沈着量 (ug/dish)' and ranges from 0 to 1500. The x-axis represents 'コンフルエント後の培養期間 (週)' (Weeks after confluence) with categories 1, 2, 3, and 4. There are four treatment groups represented by different patterns: 1. Solvent (0.1% ethanol) - white bars, 2. 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁹ M - dotted bars, 3. 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁸ M - cross-hatched bars, and 4. 1,25(OH)₂D₃ 10⁻⁷ M - diagonal hatched bars. Error bars are present on all bars. Statistical significance is indicated by asterisks: ** for p < 0.01 and * for p < 0.05. The solvent group shows a steady increase in Ca deposition over time. The 10⁻⁹ M group shows a significant decrease at week 2 compared to week 1. The 10⁻⁸ M group shows a significant increase at week 2 compared to week 1. The 10⁻⁷ M group shows a significant increase at week 2 compared to week 1. At week 4, the 10⁻⁹ M group shows a significant increase compared to week 3, while the 10⁻⁸ M and 10⁻⁷ M groups show significant decreases compared to week 3.



THIS PAGE BLANK (USPTO)

図 2 1



*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$ 対培地
(ダンネット多重比較)

THIS PAGE BLANK (USPTO)

15
TT
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

06.03.1998

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference YCT-316	FOR FURTHER ACTION: See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP98/00924	International filing date (<i>day month year</i>) 06 March 1998 (06.03.1998)	Priority date (<i>day month year</i>) 07 March 1997 (07.03.1997)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 5/06, C12Q 1/68, G01N 33/50, A61K 31/00, 35/00		
Applicant CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>	
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>	

Date of submission of the demand 15 April 1998 (15.04.1998)	Date of completion of this report 23 February 1999 (23.02.1999)
Name and mailing address of the IPEA/JIP Japanese Patent Office, 4-3 Kasumigaseki 3-chome Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan Facsimile No.	Authorized officer Telephone No. (81-3) 3581 1101

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP98/00924

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
pages _____, as originally filed
pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
pages _____, as originally filed
pages _____, filed with the demand
pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 98/00924

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-13	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

The invention disclosed in Claims 1 through 13 is not disclosed in any of the documents cited in the international search report. Moreover, it is not obvious to a person skilled in the art.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁹ C12N5/06, C12Q1/68, G01N33/50, A61K31/00, A61K35/00,
A61K38/00 // (C12N5/06, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁹ C12N5/06, C12Q1/68, G01N33/50, A61K31/00, A61K35/00, A61K38/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/DBJ/EMBL (Geneseq)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category ⁴	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	The Journal of Cell Biology, Vol. 106, (1988), Jane E. Aubin et al., "Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone.", see p.2139-2151	1-4/5-13
Y/A	The Journal of Cell Biology, Vol. 130, (1995), A. Poliard, et al., "Controlled Conversion of an Immortalized Mesodermal Progenitor Cell Towards Osteogenic, Chondrogenic, or Adipogenic Pathways", see p.1461-1472	1-4/5-13
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 261, (1986), Karl A. Piez, et al., "Cartilage-inducing Factor-A", see p.5693-5695	10-13

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

⁴ Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

June 2, 1998 (02. 06. 98)

Date of mailing of the international search report

June 9, 1998 (09. 06. 98)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC)) Int.Cl. C12N5/06, C12Q1/68, G01N33/50, A61K31/00, A61K35/00, A61K38/00 (C12N5/06, C12R1:91)		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC)) Int.Cl. C12N5/06, C12Q1/68, G01N33/50, A61K31/00, A61K35/00, A61K38/00		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語) BIOSIS(DIALOG), WPI(DIALOG), GenBank/DDBJ/EMBL(Geneseq)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/A	The Journal of Cell Biology, Vol. 106, (1988), Jane E. Aubin et al., "Differentiation of Muscle, Fat, Cartilage, and Bone from Progenitor Cells Present in a Bone-derived Clonal Cell Population: Effect of Dexamethasone.", see p. 2139-2151	1-4 / 5-13
Y/A	The Journal of Cell Biology, Vol. 130, (1995), A. Poliard, et al. "Controlled Conversion of an Immortalized Mesodermal Progenitor Cell Towards Osteogenic, Chondrogenic, or Adipogenic Pathways", see p. 1461-1472	1-4 / 5-13
A	The Journal of Biological Chemistry, Vol. 261, (1986), Karl A. Piez, et al. "Cartilage-inducing Factor-A", see p. 5693-5695	10 - 13
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「I」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に関する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.06.98	国際調査報告の発送日 09.06.98	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 齊藤 真由美 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 8931

THIS PAGE BLANK (USPTO)



P.B. 5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

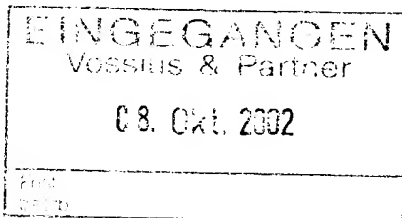
European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

VOSSIUS & PARTNER
Siebertstrasse 4
81675 München
ALLEMAGNE



Datum/Date

08.10.02

Zeichen/Ref./Ref.

D 2237 EP

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°

98905787.2-2405-JP9800924

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

☒ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.



THIS PAGE BLANK (USPTO)



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
PARTIAL EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number

which under Rule 45 of the European Patent Convention shall be considered, for the purposes of subsequent proceedings, as the European search report

EP 98 90 5787

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
X	PITTENGER M F ET AL: "HUMAN MESENCHYMAL STEM CELLS CAN BE DIRECTED INTO CHONDROCYTES, ADIPOCYTES AND OSTEOCYTES" MOLECULAR BIOLOGY OF THE CELL, BETHESDA, MD, US, vol. 7, 7 December 1996 (1996-12-07), page 305A XP000882095 ISSN: 1059-1524 * the whole document *	1-14	C12N5/06 C12Q1/68 G01N33/50 A61K31/00 A61K35/00 A61K38/00 /(C12N5/06, C12R1:91)
X	JOHNSTONE B ET AL.: "in vitro chondrogenesis of bone marrow-derived mesenchymal cells" TRANS. ORTHO. RES.SOC., vol. 21, no. 64, 1996, XP001099032 * the whole document *	1-14	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
			G01N C12N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
INCOMPLETE SEARCH			
The Search Division considers that the present application, or some or all of its claims, does/do not comply with the EPC to such an extent that a meaningful search into the state of the art cannot be carried out, or can only be carried out partially, for the following claims:			
Claims searched completely :			
Claims searched incompletely :			
Claims not searched			
Reason for the limitation of the search: see sheet C			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 16 September 2002	Examiner Dumont, E
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS			
X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

1
EPO FORM 1503 03.82 (P04C20)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
X	GIMBLE J M ET AL: "Bone morphogenetic proteins inhibit adipocyte differentiation by bone marrow stromal cells." JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, vol. 58, no. 3, 1995, pages 393-402, XP001094236 ISSN: 0730-2312 * abstract *	1-14	
X	PIETRANGELI C E ET AL: "STROMAL CELL LINES WHICH SUPPORT LYMPHOCYTE GROWTH CHARACTERIZATION SENSITIVITY TO RADIATION AND RESPONSIVENESS TO GROWTH FACTORS" EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol. 18, no. 6, 1988, pages 863-872, XP009000016 ISSN: 0014-2980 * abstract * p.864, col. 1, 2.1 and 2.2; p. 867, col.1, paragraph 4 (3.3.).	1-14	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)
P,X	WO 98 04682 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC ;PITTINGER MARK F (US)) 5 February 1998 (1998-02-05) * abstract * * page 4, paragraph 4 - page 5, paragraph 4 * * page 14, paragraph 2 - page 15, paragraph 3 *	1-14	
P,X	WO 97 39104 A (OSIRIS THERAPEUTICS INC ;UNIV CASE WESTERN RESERVE (US); BRUDER SC) 23 October 1997 (1997-10-23) * abstract * * page 12, paragraph 2 * * page 24, last paragraph * * page 25 *	1-14	
	--- -/--		

THIS PAGE BLANK (USPTO)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.6)
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	
A	AIKAWA TOMONAO ET AL: "Establishment of bone morphogenetic protein 2 responsive chondrogenic cell line." JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, vol. 11, no. 4, 1996, pages 544-553, XP001095224 ISSN: 0884-0431 * abstract * * page 545, column 1, last paragraph - column 2, paragraph 1 * -----	1-14	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.6)

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Claim(s) searched incompletely:
11-14

Reason for the limitation of the search:

Present claims 11-14 relate to an extremely large number of possible compounds or to their use. Support within the meaning of Article 84 EPC and disclosure within the meaning of Article 83 EPC is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds 1,25-dihydroxyvitamin D₃, all trans-retinoic acid, human TGF-beta1, IL-1, TNF-alpha, human insulin-like growth factor-I.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 98 90 5787

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report.
The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

16-09-2002

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9804682	A	05-02-1998	US 5827740 A	27-10-1998
			AU 3729097 A	20-02-1998
			EP 0954565 A1	10-11-1999
			JP 2001523084 T	20-11-2001
			WO 9804682 A1	05-02-1998
			US 6322784 B1	27-11-2001
WO 9739104	A	23-10-1997	AU 2730497 A	07-11-1997
			WO 9739104 A1	23-10-1997

THIS PAGE BLANK (USPTO)